

Electroporation plate implanting living cells in suspension, with nucleic acids, proteins or low molecular weight substances, comprises anode and cathode tracks defining regular pattern of gaps forming reaction zones**Publication number:** DE19917571**Publication date:** 2000-11-02**Inventor:** POPPE ROBERT (DE)**Applicant:** POPPE ROBERT (DE)**Classification:****- international:** C12M1/42; C12M3/00; C12M1/42; C12M3/00; (IPC1-7): C12M1/42**- European:** C12M1/42; C12M3/00E**Application number:** DE19991017571 19990419**Priority number(s):** DE19991017571 19990419**Report a data error here****Abstract of DE19917571**

Electroporation plate implanting living cells in suspension, with nucleic acids, proteins or low molecular weight substances, comprises anode and cathode tracks defining regular pattern of gaps forming reaction zones. Planar electrode grids comprising metallic tracks, are formed on the surface of an electrically-insulating plate (e). Interdigitating anode and cathode tracks, branch normally and repeatedly, at regular intervals. Branch ends face each other, forming gaps between the anode and cathode electrodes (d). These gaps are reaction zones (c) accepting the materials which will participate in electroporation. Opposite track ends perpendicular to the electrode plane, form walls in spatially-separated chambers.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 199 17 571 A 1**

⑤① Int. Cl.⁷:
C 12 M 1/42

⑦① Aktenzeichen: 199 17 571.3
⑦② Anmeldetag: 19. 4. 1999
⑦③ Offenlegungstag: 2. 11. 2000

DE 199 17 571 A 1

⑦① **Anmelder:**
Poppe, Robert, Dr., 55128 Mainz, DE

⑦② **Erfinder:**
gleich Anmelder

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤④ **Elektrodenraster für Elektroporationsreaktionsansätze**

⑤⑦ Bei Standard-Elektroporationsküvetten kann ein Volumen von 50 µl für die durch Elektroporation zu behandelnde Zellsuspension kaum unterschritten werden.

Weiterhin können verschiedene Elektroporationsreaktionsansätze nur nacheinander ausgeführt werden, wobei die Handhabung schwer zu automatisieren ist. Das neue Elektrodenraster erlaubt die parallele und automatisierbare Behandlung von zahlreichen Elektroporationsansätzen mit Volumen bis unter 0,1 µl.

Durch die Anordnung eines Elektrodenrasters auf einer Oberfläche entstehen zwischen den gegenüberstehenden Verastelungen von Anoden- und Kathodenleiterbahnen Reaktionszonen für Mikroelektroporationsreaktionen, die eine parallele Bearbeitung zahlreicher verschiedener Elektroporationsansätze ermöglichen. Je nach Anordnung und Abmessung der Anoden- und Kathodenleiterbahnen können unterschiedliche Oberflächen mit der gewünschten Zahl und Dichte an Mikroelektroporationszonen hergestellt werden.

Die Anpassung der Elektroporationsreaktionsanordnung an Standardmikrotiterplattenformate erlaubt die automatisierbare und hochparallele Durchführung von Elektroporationsreaktionen mit robotergesteuerten Pipettiersystemen.

DE 199 17 571 A 1

Beschreibung

Es ist bekannt, daß die Membran lebender Zellen unter Einfluß eines elektrischen Pulses kurzzeitig für Makromoleküle wie z. B. Nukleinsäuren und Proteine und für niedermolekulare Substanzen durchlässig wird. Dieses Verfahren der Elektroporation hat, besonders wegen der hohen Effizienz, mit der Desoxyribonukleinsäuren (DNA) in die Zelle übertragen werden können, eine weitverbreitete Anwendung zum Transfer wasserlöslicher Moleküle in lebende Zellen erlangt (Handbuch "Cell Biology: A Laboratory Handbook, Academic Press, 1998, Vol. 4, Seiten 57-63). Bei Standard-Elektroporationskammern stehen sich Anode und Kathode in Form von Metallplatten gegenüber. Die durch Elektroporation zu behandelnde Zellsuspension wird in die Elektroporationskammer gefüllt und diese mit dem Spannungsgenerator verbunden. Hierbei können Volumina von 50 µl Zellsuspension kaum unterschritten werden. Weiterhin können verschiedene Elektroporationsreaktionsansätze nur nacheinander ausgeführt werden, wobei die Handhabung schwer zu automatisieren ist.

Der im Patentanspruch 1 angegebenen Erfindung liegt das Problem zugrunde, zahlreiche Elektroporationsreaktionsansätze parallel mit kleinen Reaktionsvolumina durchzuführen und die Handhabung leicht automatisierbar zu machen.

Dieses Problem wird durch die im Patentanspruch 1 aufgeführten Merkmale gelöst.

Die mit der Erfindung erzielten Vorteile bestehen insbesondere darin, daß durch die Anordnung eines Elektrodenrasters auf einer Oberfläche, zwischen den gegenüberstehenden Verästelungen von Anoden- und Kathodenleiterbahnen Reaktionszonen für Mikroelektroporationsreaktionen entstehen, die eine parallele Bearbeitung zahlreicher Elektroporationsreaktionsansätze ermöglichen. Auf verschiedenen Mikroelektroporationsreaktionszonen platzierte Elektroporationsreaktionsansätze können parallel einem elektrischen Puls ausgesetzt werden, indem die Hauptäste der Anoden- und Kathodenleiterbahnen mit dem Spannungsgenerator verbunden werden. Je nach Abmessung der sich gegenüberstehenden Äste von Anoden- und Kathodenleiterbahnen können zwischen den Elektrodenästen Reaktionsvolumina von unter 100 nl bis über 5 µl aufgetragen werden. Je nach Anordnung und Abmessung der Anoden- und Kathodenleiterbahnen können unterschiedliche Oberflächen mit der gewünschten Zahl und Dichte an Mikroelektroporationsreaktionszonen hergestellt werden. Die Anpassung der Elektroporationsreaktionszonenanordnung an Standardmikrotiterplattenformate erlaubt das Auftragen und Bearbeiten von Elektroporationsreaktionsansätzen mit robotergesteuerten Pipettiersystemen.

Eine vorteilhafte Ausgestaltung der Erfindung ist in Patentanspruch 2 angegeben. Die räumliche Abtrennung der einzelnen Elektroporationsreaktionszonen untereinander durch senkrecht zur Leiterbahnoberfläche stehende Wände verringert das Risiko einer Kontamination zwischen benachbarten Elektroporationsreaktionszonen und ermöglicht es, nach der Durchführung der Elektroporation weitere Inkubationslösungen zu den einzelnen Elektroporationsansätzen zuzufügen, ohne daß es zu einer Vermischung der einzelnen Ansätze untereinander kommt.

Ein Ausführungsbeispiel der Erfindung ist in der Zeichnung dargestellt und wird im folgenden näher beschrieben. Es zeigt

Fig. 1. Elektrodenraster für Elektroporationsreaktionsansätze im 96er Mikrotiterplattenformat.

Bei dem Ausführungsbeispiel befindet sich das Elektrodenraster auf einer elektrisch isolierenden Kunststoffoberfläche (e). Die Verästelungen von Anoden- und Kathoden-

leiterbahnen bilden 96 Reaktionszonen (c) in denen sich je ein Anoden- (d) und ein Kathodenast (d) gegenüber stehen. Die Elektrodenäste können zum Beispiel photolithographisch durch Platinenätztechnik aus Kupfer in 35 µm Schichtdicke abgebildet werden. In der Beispielsausführung im 96er Mikrotiterplattenformat sind gegenüberstehende Elektrodenäste (d) durch eine Lücke von 1 mm voneinander getrennt und 3 mm breit. Die Abstände zwischen den Zentren benachbarter Elektroporationsreaktionszonen betragen in der Beispielsausführung 9 mm. Auf die 96 Elektroporationsreaktionszonen können verschiedene Elektroporationsreaktionsansätze mit einem Volumen von 5 µl derart aufgetragen werden, daß die Lücke zwischen gegenüberstehenden Elektrodenästen durch die Elektroporationsflüssigkeit überbrückt wird. Auf verschiedenen Mikroelektroporationsreaktionszonen platzierte Tropfen von Elektroporationsreaktionsansätzen können parallel einem elektrischen Puls ausgesetzt werden, indem die Hauptäste der Anoden- (a) und Kathodenleiterbahnen (b) mit dem Spannungsgenerator verbunden werden.

Patentansprüche

1. Elektrodenraster für Elektroporationsreaktionsansätze mit suspendierten lebenden Zellen, insbesondere für die Übertragung von Nukleinsäuren, Proteinen oder niedermolekularen Substanzen aus der Suspensionslösung in die Zelle durch reversible Permeabilisierung der Zellmembran mit Hilfe eines oder mehrerer elektrischer Pulse geeigneter Feldstärke und Dauer, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Elektrodenraster in planarer Anordnung von metallischen elektrischen Leiterbahnen auf der Oberfläche eines elektrischen Isolators gebildet wird.
2. Anoden- und Kathodenleiterbahnen stehen sich in Verästelungen gegenüber und bilden zusammen mit der Lücke zwischen den Elektrodenastenden Elektroporationsreaktionszonen für die Aufnahme von Elektroporationsreaktionsansätzen.
2. Elektrodenraster nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sich die von gegenüberstehenden Verästelungen von Anoden- und Kathodenleiterbahnen gebildeten Elektroporationsreaktionszonen durch senkrecht zur Oberfläche des Elektrodenrasters stehende Wände in räumlich voneinander getrennten Kammern befinden.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

Fig.1

